

COLLOIDAL SUSPENSION OF NANOPARTICLES BASED ON AN AMPHIPHILIC COPOLYMER

Publication number: WO02078677 (A1)

Publication date: 2002-10-10

Inventor(s): SOULA GERARD [FR]; BRYSON NATHAN [FR] +

Applicant(s): FLAMEL TECH SA [FR]; SOULA GERARD [FR]; BRYSON NATHAN [FR] +

Classification:

- International: A61K31/7088; A61K31/715; A61K38/00; A61K38/28;
A61K39/00; A61K8/06; A61K8/64; A61K8/86; A61K8/90;
A61K9/107; A61K9/51; A61P3/10; A61P5/50;
A61K31/7088; A61K31/715; A61K38/00; A61K38/28;
A61K39/00; A61K8/04; A61K8/30; A61K8/72; A61K9/107;
A61K9/51; A61P3/00; A61P5/00; (IPC1-7): A61K9/51

- European: A61K9/51

Application number: WO2002FR01045 20020326

Priority number(s): FR20010004512 20010402

Also published as:

US2004138095 (A1)

US7709445 (B2)

MXPA03009007 (A)

JP2004525939 (T)

FR2822834 (A1)

more >>

Cited documents:

GB2240547 (A)

FR2786098 (A1)

XP004143517 (A)

Abstract of WO 02078677 (A1)

The invention concerns an aqueous suspension, stable in physiological medium, of nanoparticles for delivering active principle for example insulin. Said delivering particles are based on a three-block copolymer: poly(ethylene glycol)/hydrophilic poly(amine acid)/hydrophobic poly(amine acid). Said three-block copolymer particles can be associated with an active principle without denaturing it, and providing a controlled and long-term release of said active principle *in vivo*, thereby providing the active principle with very prolonged release. The invention also concerns the powder-form solid from which are derived the delivering particles and the preparation of said powder-form solid and said suspension of delivering particles based on three-block copolymer. The invention further concerns pharmaceutical specialities obtainable from said delivering particles filled with active principle.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
10 octobre 2002 (10.10.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/078677 A1

- (51) Classification internationale des brevets⁷ : **A61K 9/51**
- (52) Numéro de la demande internationale : **PCT/FR02/01045**
- (53) Date de dépôt international : 26 mars 2002 (26.03.2002)
- (54) Langue de dépôt : français
- (55) Langue de publication : français
- (56) Données relatives à la priorité : 01/04512 2 avril 2001 (02.04.2001) FR
- (57) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : FLAMEL TECHNOLOGIES [FR/FR]; Parc du Moulin à Vent, 33 Avenue du Docteur Georges Lévy, F-69693 VENISSIEUX CEDEX (FR).
- (58) Inventeurs; et
- (59) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : SOULA, Gérard [FR/FR]; 33 rue Nungesser, F-69330 MEYZIEU (FR). BRYSON, Nathan [FR/FR]; 120 rue du Coteau, F-69390 MILLERY (FR).
- (60) Mandataires : CABINET PLASSERAUD etc.; 84 rue d'Amsterdam, F-75440 PARIS CEDEX 9 (FR).



(61) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(62) États désignés (régional) : brevet ARPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont requises

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: COLLOIDAL SUSPENSION OF NANOPARTICLES BASED ON AN AMPHIPHILIC COPOLYMER

(54) Titre : SUSPENSION COLLOIDALE DE NANOParticules A BASE D'UN COPOLYMORE AMPHIPHILE

(55) **Abstract:** The invention concerns an aqueous suspension, stable in physiological medium, of nanoparticles for delivering active principles for example insulin. Said delivering particles are based on a three-block copolymer: *polyethylene glycol/hydrophilic polyaminoacid/hydrophobic polyaminoacid*. Said three-block copolymer particles can be associated with an active principle without denaturing it, and perform a controlled and long-term release of said active principle *in vivo*, thereby providing the active principle with very prolonged release. The invention also concerns the powder-form solid from which are derived the delivering particles and the preparation of said powder-form solid and said suspension of delivering particles based on three-block copolymer. The invention further concerns pharmaceutical specialities obtainable from said delivering particles filled with active principle.

(56) **Abbrégé :** L'invention concerne une suspension aquacuse, stable en milieu physiologique, de nanoparticules de vectorisation PV de principes actifs PA (par ex. insuline). Ces PV sont à base d'un copolymère tri bloc: *PolyÉthylène-Glycol/polyaminoacide hydrophile/polyaminoacide hydrophobe*. Ces particules de copolymère tri bloc peuvent s'associer à un PA sans le dénaturer, puis relâcher ce PA in vivo de façon contrôlée et pendant une très longue durée. Cela assure donc au PA une durée d'action très prolongée. L'invention vise, également, le solide polyméru à partir duquel sont issues les PV ainsi que la préparation de ce solide polyméru et de cette suspension de PV à base de copolymère tri bloc. L'invention concerne les spécialités pharmaceutiques susceptibles d'être obtenues à partir de ces particules de vecteur-saison chargées en principe actif.

WO 02/078677 A1

SUSPENSION COLLOIDALE DE NANOParticULES A BASE DE COPOLYMERE
AMPHIPHILE, POUR LA VECTORISATION DE PRINCIPES ACTIFS

Le domaine de la présente invention est celui des Nanoparticules de Vectorisation (PV), utiles pour l'administration de principes actifs (PA). Ces derniers sont, de préférence, des médicaments ou des nutriments pour l'administration à un organisme animal ou humain par voie orale ou nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, 5 intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale, etc. En termes de nature chimique, les PA plus particulièrement concernés par l'invention sont hydrophiles, par exemple, des protéines, des glycoprotéines, des peptides, des polysaccharides, des lipopolysaccharides, ou des 10 polynucléotides.

La présente invention concerne, plus précisément, des suspensions colloïdales de Nanoparticules de Vectorisation (PV), à base de blocs de polyaminoacides et polymères hydrophiles du type PolyAlkylène-Glycol (PAG), de préférence 15 PolyEthylène-Glycol (PEG).

La présente invention vise aussi bien des PV en tant que telles, que des systèmes vecteurs de PA, constitués par des PV chargées en PA.

La présente invention a également trait à des solides 20 pulvérulents comprenant ces PV.

L'invention concerne, également, des procédés de préparation desdites suspensions colloïdales de particules, chargées en PA.

L'association de PA avec des PV a notamment, pour but de 25 modifier leur durée d'action et/ou de les acheminer au lieu du traitement et/ou augmenter la biodisponibilité desdits PA. De nombreuses techniques d'association ont déjà été proposées. De telles techniques visent, d'une part, à permettre le transport du PA jusqu'à son site d'action thérapeutique, tout en le 30 protégeant contre les agressions de l'organisme (hydrolyse,

digestion enzymatique, etc.) et, d'autre part, à contrôler la libération du PA sur son site d'action, afin de maintenir la quantité disponible pour l'organisme au niveau désiré. Les PA concernés par ces avatars de transport et de séjour dans 5 l'organisme sont, par exemple, des protéines mais peuvent être, également, des produits tout autre, des molécules organiques d'origine synthétique ou naturelle. La revue de M.J. HUMPHREY (*Delivery system for peptide Drugs*, éditée par S. DAVIS et L. ILLUM, Plenum Press, N.Y. 1986), fait état de la problématique 10 concernant l'amélioration de la biodisponibilité des PA et l'intérêt des systèmes de vectorisation et de libération contrôlée.

En fait, on distingue deux types principaux de systèmes de 15 vectorisation et de libération contrôlée de PA, qui sont caractérisés par le mode d'association du PA avec les PV, à savoir :

- l'association par adsorption, illustrée par la figure 1 annexée,
- et l'association par encapsulation (ou par enrobage), 20 illustrée par la figure 2 annexée.

L'association du PA aux PV par adsorption spontanée, est celle qui est concernée par la présente invention. Généralement, les techniques d'adsorption spontanée sont moins 25 agressives vis à vis des PA que les techniques d'association par encapsulation, dans lesquelles on a souvent recours à des solvants et/ou des tensioactifs, ainsi que des étapes de procédé (émulsification, évaporation, distillation), propres à dénaturer les PA, et en particulier les PA de nature 30 protéique(préservation de la structure secondaire native), qui constituent la majorité des PA usuels visées. Dans le cas d'une association par adsorption, la libération s'opère par désorption.

Au-delà des modes d'association/relargage du PA vis à vis 35 des PV, les matériaux constitutifs des PV doivent présenter des

propriétés d'usage particulières. Finalement, le cahier des charges que l'on souhaite obtenir pour les PV est particulièrement exigeant et comprend, notamment, les spécifications suivantes.

- 5 1 La première spécification recherchée pour les PV est :
- o d'une part, que les PV s'associent aisément avec les PA pour former des systèmes PV-PA qui permettent une libération et une action prolongées du PA in vivo (par exemple, une durée d'action d'au moins 24 heures pour un PA = insuline),
 - o et d'autre part, que ces PV (chargées ou non en PA) forment des suspensions aqueuses stables (par exemple au moins pendant plusieurs mois), sans l'aide de solvant organique et/ou de tensioactif; c'est-à-dire les PV se maintiennent en suspension et ne floquent pas.
- 10 2 Les PV doivent être constituées d'un (co)polymère biocompatible, éliminable (par excrétion) et/ou biodégradable rapidement en produits non toxiques pour l'organisme.
- 15 3 Il est également recherché que les PV aient une taille suffisamment faible pour pouvoir subir, en suspension dans un liquide, une filtration stérilisante par un filtre dont le diamètre des pores est inférieur ou égal à 0,2 µm.
- 20 4 Il est souhaitable que les PV et les systèmes PV-PA puissent être obtenus par un procédé non dénaturant pour le PA.
- 25 5 Les PV doivent, avantageusement, permettre de contrôler la vitesse de libération du PA.
- 30 6 Une autre spécification importante est que les systèmes PV-PA puissent constituer d'excellents médicaments injectables. Cette aptitude améliorée de l'administration par injection -e.g. intraveineuse ou

intramusculaire- « injectabilité » se caractérise par :

- (i) un volume injecté réduit (pour une dose thérapeutique donnée),
- 5 (ii) une viscosité faible.

Ces deux propriétés sont satisfaites lorsque la dose thérapeutique de PA est associée à une quantité minimale de PV. En d'autres termes, les PV doivent avoir un fort taux de chargement en PA.

- 10 7 Le coût propre aux PV dans une préparation injectable doit être réduit et là encore il convient que les PV aient un fort taux de chargement en PA. En définitive, la faible taille et un fort taux de chargement sont des spécifications majeures recherchées pour les PV.
- 15 8 Il est également avantageux que le polymère, constitutif des PV, n'indue pas de réponse immunitaire.
- 9 Enfin, il est avantageux que les PV aient une durée de vie dans l'organisme au moins égale au temps de libération recherchée pour le PA.
- 20

Les propositions techniques antérieures (a) à (g), décrites infra, ont tenté de satisfaire, en vain, à l'ensemble de ces spécifications.

- 25 25 (a) Le brevet US-A-5 286 495 concerne un procédé d'encapsulation par vaporisation de protéines en phase aqueuse, à l'aide de matériaux ayant des charges opposées, à savoir : l'alginate (chargé négativement) et la polylysine (chargée positivement). Ce procédé de fabrication permet de produire des particules de taille supérieure à 35 µm.
- 30 30 (b) Par ailleurs, les techniques d'émulsion sont couramment utilisées pour préparer des microparticules chargées de PA. Par exemple, les demandes de brevets WO 91/06286, WO 91/06287 et WO 89/08449 divulguent de telles techniques
- 35

d'émulsion dans lesquelles on a recours à des solvants organiques pour solubiliser des polymères, par exemple de type polylactique. Mais il s'est avéré que les solvants peuvent être dénaturants, notamment pour les PA peptidiques ou polypeptidiques.

- (c) On connaît, également, des PV biocompatibles appelées protéinoides, décrites dès 1970 par X. FOX et K. DOSE dans « Molecular Evolution and the origin of Life », Ed. Marcel DEKKER Inc (1977). Ainsi, la demande de brevet WO 88/01213 propose un système à base d'un mélange de polypeptides synthétiques, dont la solubilité dépend du pH. Pour obtenir les microparticules matricielles selon cette invention, ils solubilisent le mélange de polypeptides, puis avec un changement de pH, ils provoquent la précipitation de particules protéinoides. Lorsque la précipitation s'effectue en présence d'un PA, celui-ci est encapsulé dans la particule.

(d) On mentionnera également, pour mémoire, le brevet US 4 351 337 qui relève d'un domaine différent de celui de la vectorisation de PA propre à l'invention. Ce brevet divulgue des implants massiques fixés et localisés à des endroits bien précis de l'organisme. Ces implants sont des tubes ou des capsules creuses de taille microscopiques (160 µm et de longueur égale à 2 000 µm), constitués de copolymères de copoly(aminoacides) -e.g. poly(acide glutamique-leucine) ou poly(benzylglutamate-leucine)- obtenus par copolymérisation de monomères de N-carboxyanhydrides d'aminoacides (NCA). L'inclusion d'un PA s'opère par une technique d'évaporation de solvant d'un mélange de polymère et de PA. Le brevet US 4 450 150 appartient à la même famille que le brevet US 4 351 337 étudié ci-dessus et a essentiellement le même objet. Les PAA constitutifs sont des poly(acide glutamique-éthylglutamate).

- (e) La demande de brevet PCT/PR WO 97/02810 divulgue une composition pour la libération contrôlée de principes actifs, comprenant une pluralité de particules lamellaires d'un polymère biodégradable, au moins en partie cristallin (polymère d'acide lactique) et d'un PA adsorbé sur leadites particules. Dans ce cas, la libération du principe actif s'opère par désorption.
- 5 (f) La demande PCT WO 96/29991 a pour objet des particules de polyaminacides utiles pour la vectorisation de PA tels que l'insuline. Ces particules ont une taille comprise entre 10 et 500 nm.
- 10 Les particules selon le WO 96/29991 se forment spontanément par mise en contact de PAA avec une solution aqueuse. Les PAA comprennent un bloc hydrophobe formé par des monomères aminoacides neutres et hydrophobes AAO (polyLeu) et un bloc hydrophile formé par des monomères ionisables et hydrophiles AAI (polyGlu).
- 15 (g) L'EP 0 583 955 divulgue des micelles polymère capables de piéger physiquement des PA hydrophobes. Ces micelles sont constitués par des copolymères bloc comportant un bloc hydrophile constitué par du PolyEthyléneglycol (PEG) et un bloc hydrophobe constitué par un PolyAminoAcide, par exemple : PEG/polyAANO (AANO = Amino-Acide Neutre hydrophobe).
- 20 25 L'AANO peut être : Leu, Val, Phe, Bz-O-Glu, Bz-O-Asp, ce dernier étant préféré. Les principes actifs PA hydrophobes piégés dans ces micelles PEG/polyAANO sont e.g.: adriamycine, indométhacine, daunomycine, methotrexate, mitomycine.
- 30 35 Dans cette demande de brevet, seuls sont exemplifiés les micelles à base de PEG/polyGlu-O-Bz. Or, il est à noter que ces esters Glu-O-Bz ne sont pas stables à l'hydrolyse en milieu aqueux. En outre, l'hydrolyse enzymatique de ces produits forme des dérivés non naturels du benzène potentiellement toxique. Par ailleurs, il n'est nullement

question dans ce document de particules constituées par un copolymère bloc PEG/polyAANO, dont le cœur est formé par le polyamino acide neutre hydrophobe et comprenant une chevelure externe hydrophile à base de PEG, ces particules étant aptes à s'associer avec des PA hydrophiles et à les libérer *in vivo*.

On sait par ailleurs que les PEG ne sont pas biodégradables et sont même susceptibles de protéger des PV d'une dégradation enzymatique, nuisant ainsi à la biodégradabilité *in vivo* des PV, l'une des caractéristiques essentielles recherchées dans le cadre de la présente invention.

Il ressort donc de ce qui précède que les propositions techniques antérieures suscitées satisfont incomplètement aux spécifications du cahier des charges indiqué supra, et, en particulier les spécifications 1 (durée de libération et d'action *in vivo* prolongée et stabilité en suspension aqueuse des PV), 2 (biodégradabilité), 4 (obtention non dénaturante), 5 (contrôle vitesse libération), 8 (absence de réponse immunitaire).

Dans cet état de fait, l'un des objectifs essentiels est de pouvoir fournir de nouvelles PV (du type adsorption/désorption) qui forment spontanément, et sans l'aide de tensioactifs ni de solvants organiques, des suspensions aqueuses stables de PV et adaptées à la vectorisation de PA (notamment des protéines telles que l'insuline), et surtout qui permettent d'augmenter significativement la durée de libération et d'action *in vivo* du PA, par rapport aux systèmes de vectorisation connus dans l'art antérieur et présentés ci-dessus (a-g, *vide supra*).

Un autre objectif essentiel de la présente invention est de fournir de nouvelles PV en suspension aqueuse colloïdale stable (notamment à l'hydrolyse) ou sous forme pulvérulente et à

base de copolymères bloc PolyAlkylèneGlycol (PAG) / poly(aminoacides) (PAA), ces nouvelles PV se devant de satisfaire au mieux aux spécifications 1 à 9 du cahier des charges susvisé.

5 Un autre objectif essentiel de l'invention est de perfectionner les particules divulguées dans la demande EP 0 583 955.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir une suspension de PV, qui, bien que possédant une couronne 10 extérieure de PEG, soit cependant facilement biodégradable.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir une suspension nouvelle de PV dont on maîtrise parfaitement les caractéristiques, notamment en termes du taux de chargement en PA et en termes de contrôle de cinétique de libération du PA.

15 Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir des suspensions de PV médicamenteuses stables et administrables à l'homme ou l'animal, par voie orale ou parentérale, par exemple.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir 20 une suspension colloïdale aqueuse ou un solide pulvérulent comprenant des particules de vectorisation de principes actifs satisfaisant aux spécifications visées ci-dessus et qui constitue une forme galénique appropriée et convenable pour une administration, par exemple orale, à l'homme ou l'animal.

25 Un autre objectif essentiel de l'invention est de proposer un procédé de préparation de particules (sèches ou en suspension dans un liquide) de PAA utiles, notamment, comme vecteurs de principes actifs (notamment protéines telles que l'insuline), ledit procédé se devant d'être, plus simple à 30 mettre en œuvre, non dénaturant pour les principes actifs et devant en outre toujours permettre une maîtrise fine de la granulométrie moyenne des particules obtenues.

Un autre objectif essentiel de l'invention est 35 l'utilisation des susdites particules en suspension aqueuse ou sous forme solide pour la préparation de médicaments (e.g.

vaccins), en particulier pour administration notamment orale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intra-musculaire, intradermique, intra-péritonéale, ou intra-cérébrale, les principes actifs hydrophiles de ces 5 médicaments pouvant être, notamment, des protéines, des glycoprotéines, des peptides, des polysaccharides, des lipopolysaccharides, des oligonucléotides et des polynucléotides.

Un autre objectif de la présente invention est de fournir 10 un médicament, du type système à libération prolongée de principes actifs, qui soit aisé et économique à produire et qui soit, en outre, biocompatible et apte à assurer un très haut niveau de biodisponibilité du PA.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir 15 un système de vectorisation de vaccin, qui soit non immunogène intrinsèquement et en combinaison avec un ou plusieurs antigénés.

Ces objectifs (parmi d'autres) sont atteints par la 20 présente invention qui concerne, tout d'abord, une suspension colloïdale de nanoparticules susceptibles d'être utilisées, notamment pour la vectorisation de principe(s) actif(s) (PA), ces particules étant des arrangements supramoléculaires individualisés. Cette suspension a ceci de particulier, que 25 lesdites particules :

- sont à base d'au moins un copolymère amphiphile comprenant :
 - ✓ au moins un bloc de polymère(s) hydrophile(s) du type polyalkylèneglycol (PAG), de préférence polyéthylène-glycol (PEG) ;
 - ✓ et au moins un copolyaminoacide(s) (PAA) amphiphile linéaire(s), à enchaînements α -peptidiques;
- et sont aptes à s'associer en suspension colloïdale à l'état non dissous, avec au moins un PA et à libérer

celui-ci, notamment *in vivo*, de manière prolongée et/ou retardée.

L'un des fondements inventifs de ces nouvelles particules 5 de vectorisation PV, en suspension aqueuse colloïdale stable ou à l'état de solide pulvérulent, tient à la sélection originale d'un copolymère PAG/PAA amphiphile, par exemple un terpolymère bloc

[polymère hydrophile/ polyaminoacide hydrophile /polyaminoacide 10 hydrophobe], permettant d'obtenir des particules de taille nanométrique (10-500nm), qui forment une suspension colloïdale aqueuse stable, tant vis à vis de l'hydrolyse que de la flocculation, en 15 l'absence de tensioactifs et/ou de solvants et qui puissent se lier à des PA par adsorption et libérer ces PA par désorption. Dans le cas de la présente invention, l'adsorption se fait naturellement et spontanément lorsque les particules colloïdales et le PA sont mis en contact dans un milieu aqueux. L'adsorption dépend de la nature du support (PV) et la quantité 20 de support accessible au PA.

L'un des intérêts majeurs de la présente invention est qu'elle conduit à un système PV-PA ayant une durée d'action *in vivo* augmentée de manière significative (par exemple de 10h lorsque PA = insuline), par rapport aux systèmes connus, et 25 notamment par rapport au système décrit dans la demande de brevet WO 96/29991 et comprenant des PV poly(Glu)/polyLeu.

Par ailleurs, le fait que les PV soient en partie constituées d'un polyaminoacide hydrophile offre l'avantage d'une possibilité aisée de dégradation des PV par hydrolyse 30 enzymatique, ce qui facilite leur élimination de l'organisme.

De préférence, les AminoAcides du (ou des) copolyaminoacide(s) (PAA) amphiphile (s) composant les particules sont d'au moins deux types :

35 ➤ un premier type comprenant au moins un AminoAcide hydrophile(AAI) ;

➤ un deuxième type comprenant au moins un AminoAcide hydrophobe(AAO).

En pratique, le copolyaminoacide(s) (PA) amphiphile (s) 5 composant les particules comporte avantageusement au moins une séquence globalement hydrophile et au moins une séquence globalement hydrophobe.

Conformément à l'invention, la structure des copolymères amphiphiles et la nature des acides aminés AAI et AAO, sont 10 choisies de telle façon que :

- les chaînes de polymères se structurent spontanément sous forme de particules (PV) de petite taille,
- les particules forment une suspension colloïdale stable dans l'eau et en milieu physiologique,
- 15 • les PV s'associent avec des protéines ou autres PA en milieu aqueux (en l'absence de solvant organique et/ou de tensioactif), par un mécanisme spontané et non dénaturant pour le PA,
- les PV libèrent les PA du complexe d'association PA- 20 PV dans les conditions physiologiques, et plus précisément *in vivo*, avec des profils pharmacocinétique et pharmacodynamique idoines pour des utilisations à titre de médicaments; la cinétique de libération est fonction de la nature du copolymère PAG/PAA (=PolyAAI/PolyAAO) précurseur 25 des PV.

Ainsi, en jouant sur la structure bloc particulière du copolymère, on peut contrôler les phénomènes d'association et 30 de libération du PA sur le plan cinétique et quantitatif.

La fraction hydrophobe polyAAO participe à l'agrégation des chaînes polymères, ce qui est au cœur de la formation des PV.

Suivant une modalité remarquable de l'invention:

- l'(ou les) aminoacide(s) hydrophile(s) (AAI), sont sélectionné(s) dans le groupe comprenant :
 - les AminoAcides à chaîne(s) ionisable(s), au moins partiellement ionisés, de préférence Glu et/ou Asp et leurs sels et/ou Lys; naturels et non-naturels
 - et leurs mélanges ;
 - et l'(ou les) AminoAcide(s) hydrophobe(s) (AAO), sont sélectionné(s) dans le groupe comprenant :
 - les acides aminés neutres naturels, avantageusement ceux du sous-groupe : Leu, Ile, Val, Ala, Pro, Phe, et leurs mélanges ;
 - des acides aminés neutres, rares ou synthétiques, avantageusement ceux du sous-groupe : norleucine, norvaline et leurs mélanges ;
 - des dérivés des acides aminés polaires avantageusement ceux du sous-groupe : glutamate de méthyle, glutamate d'éthyle, aspartate de benzyle, N-acétyllysine et leurs mélanges ;
 - et leurs mélanges.
- 20 Selon un préféré de réalisation de l'invention, le copolyaminoacide(s) (PAA) amphiphile (s) composant le copolymère amphiphile constitutif des particules, présente une structure "bloc".
- 25 Selon une variante, ce copolyaminoacide(s) (PAA) amphiphile (s) peut avoir une structure "statistique" (ou "aléatoire" ou "randomisée"), pour autant qu'il comporte toujours au moins une séquence globalement hydrophile et au moins un séquence globalement hydrophobe, qui lui confère son amphiphilie.
- Le PAA amphiphile "bloc" préféré comporte avantageusement:
 - o au moins une séquence globalement hydrophile essentiellement constituée d'aminoacides AAI, et ayant une longueur absolue supérieure ou égale à 5 monomères AAI, de préférence

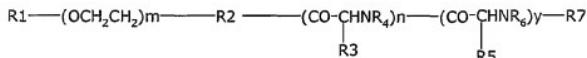
- supérieure ou égale à 200 monomères AAI, et plus préférentiellement encore comprise entre 10 et 50 monomères AAI
- o et au moins une séquence globalement hydrophobe essentiellement constituée d'acides aminés AAO, ayant une longueur absolue supérieure ou égale à 5 monomères AAO, de préférence supérieure ou égale à 10 monomères AAO, et plus préférentiellement comprise entre 10 et 50 monomères AAO.

S'agissant du PAG hydrophile - de préférence le PEG -, il se présente avantageusement sous la forme d'un bloc dont la longueur absolue est supérieure ou égale à 5 monomères, de préférence comprise entre 5 et 120 monomères, et plus préférentiellement encore comprise entre 5 et 50 monomères. Il est à noter que les blocs de PAG (e.g. PEG) peuvent être des homopolymères ou des copolymères, les homopolymères étant plus particulièrement appréciés.

De manière plus préférée encore, il est du mérite de la demanderesse d'avoir choisi, à titre de matériau constitutif des PV, une classe particulière de terpolymères bloc : polymère hydrophile/polyaminoacide hydrophile/polyaminoacide hydrophobe, qui sont amphiphiles et chargés. Cette amphiphilie permet d'obtenir des propriétés nouvelles et surprenantes et notamment celles évoquées ci-dessus. Ainsi, les PV selon l'invention forment des suspensions aqueuses stables, en l'absence de tout tensioactif et de tout solvant organique et à des pH physiologiques. De plus, grâce au choix de la structure en tribloc, incorporant une séquence hydrophile à base d'acides aminés entre la partie PAG et la partie hydrophobe, les PV sont facilement dégradables *in vivo* par une réaction d'hydrolyse enzymatique. C'est l'un des points clés du système terpolymère selon le mode préféré de réalisation de l'invention.

En outre, les associations PV-PA se font spontanément et surtout permettent une libération et donc une action *in vivo* pendant de très longues durées (par exemple, 30 heures et plus avec une protéine telle que l'insuline). Ainsi, le temps 5 d'action du PA *in vivo* est suffisamment long pour augmenter significativement la couverture thérapeutique et par suite améliorer le confort du patient.

Suivant un exemple de réalisation concrète de l'invention, 10 les particules sont constituées de chaînes de copolymères amphiphiles "triblocs linéaires" PEG/AAI/AAO, correspondant de préférence à la formule suivante :



15 dans laquelle :

- ◆ R1 = H, alkyle linéaire ou branché en C₁-C₂₀ (substitué ou non), aryle de préférence benzyle (substitué ou non);
- ◆ R2 = NH, CO-NH, CS-NH, R8-(CH₂)_t-R9 avec R8, R9 20 choisi indépendamment parmi = OCO, OCONH, NHCO, NHCONH, CONH, COO, NH, CO; t = 1-6, [NHCH(R1)CO]_x;
- ◆ R3 = radicaux identiques ou différents le long de la chaîne et choisis parmi les groupements définissant des aminoacides hydrophiles, ionisables 25 (naturels ou dérivés synthétiques) à savoir de préférence les groupements (CH₂)_pC₆H₄OM, (CH₂)_pCO₂M, (CH₂)_pN(H_aR1_b)₃X avec p ≥ 1, de préférence = 1 ou 2; a et b sont des valeurs comprise entre 0 et 3 et a+b = 3 ; X étant de préférence un anion chlorure, bromure, sulfate, nitrate, hydrogénophosphate, acétate, lactate;
- ◆ R4 = radicaux identiques ou différents le long de la chaîne et choisis parmi les groupements H, Me;

- ◆ R5 = radicaux identiques ou différents le long de la chaîne et choisis parmi les groupements définissant des aminoacides hydrophobes (naturels ou dérivés synthétiques) à savoir de préférence les groupements H, R1, $(CH_2)_qC_6H_5$, $(CH_2)_qC_6H_4OR1$, $(CH_2)_qOR1$, $(CH_2)_qCO_2R1$, $(CH_2)_qCON(R1)_2$, avec $q \geq 1$, de préférence = 1 ou 2;
- ◆ R6 = R4 ;
- ◆ R7 = H, R1CO avec R1 tel que défini supra, alkyle linéaire ou branché en C₁-C₂₀ (substitué ou non), aryle de préférence benzyle (substitué ou non), hydroxylalkyle en C₁-C₆, H, -(CH₂)_wOH, -(CH₂)_wCO₂M, -(CH₂)_w(CHR1)_zOH, -(CH₂)_wNH₂, -(CH₂)_yC₆H₄OH, (CH₂)_yCO-N(R1)_z; R10 = H, Me, (CH₂)_wOH., avec w, z et v ≥ 1 et M = métal ou cation, typiquement un métal alcalin comme Na, Li, K, ou NH₄, R1_aNH_b ;
- ◆ m > 1; n > 3.; y ≥ 0 ; a+b = 4.

Conformément à l'invention, le fait d'avoir une séquence hydrophile polyaminoacide (polyAAI) dans le copolymère constitutif des PV, est une disposition particulièrement avantageuse en ce que cela améliore la biodégradabilité des PV. Cette séquence PolyAAI est préféablement disposée entre un bloc polymère hydrophile et une séquence hydrophobe polyaminoacide (polyAAO).

Les particules PV selon l'invention ont une taille moyenne comprise entre 10 et 500 nm, de préférence entre 10 et 200 nm. Au sens de l'invention, on entend, par taille ou granulométrie moyenne, le diamètre hydrodynamique moyen.

L'un des atouts de l'invention est d'être parvenu à un très bon contrôle de la granulométrie moyenne des ces entités et de leur répartition granulométrique. Le contrôle de l'autoassociation des chaînes de polymère et donc, de la taille PV, s'opère par l'intermédiaire de la composition en polyaminoacides, mais aussi, pour une même composition, par le

choix d'une structure bloc et le procédé d'obtention. De cette manière, la taille des particules est extrêmement faible, de l'ordre de quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres.

5 La suspension selon l'invention est aqueuse et stable.

La présente invention vise, non seulement des suspensions de particules nues, telles que définies ci-dessus, mais également des suspensions de particules comprenant au moins un principe actif PA.

10 Ces particules, associées ou non avec un PA, sont, avantageusement, sous forme dispersée dans un liquide aqueux, mais peuvent également être à l'état de solide pulvérulent, obtenu à partir de la suspension de PV telle que définie ci-dessus.

15 L'invention concerne, donc, outre une suspension colloïdale aqueuse de PV, un solide pulvérulent comprenant des PV et obtenu à partir de la suspension selon l'invention.

Il est à noter que la nature de la distribution des groupements hydrophobes sur les chaînes de polymères est 20 contrôlable de par la voie de synthèse choisie. A cet égard, il existe de nombreux schémas réactionnels conduisant aux polymères sélectionnés comme matière première pour l'obtention des PV selon l'invention.

Conformément à l'invention, on retient un mode particulier 25 de préparation des PV et de la suspension de PV.

Ainsi, un autre objet essentiel de l'invention se rapporte à la préparation des particules sélectionnées (telles que décrites ci-avant), aussi bien sous forme de suspension colloïdale que sous forme de solide pulvérulent. Le procédé de 30 préparation considéré consiste, essentiellement :

- * à synthétiser des copolymères PAG/polyAAI/polyAAO précurseurs des PV et à les transformer en particules PV structurées ;
- * éventuellement à purifier les particules ainsi produites ;

* éventuellement à isoler ces particules, de préférence par concentration, lyophilisation, filtration ou séchage.

5 Plus précisément, il s'agit, tout d'abord, d'un procédé de préparation du solide pulvérulent susvisé et formé par de particules structurées nanométriques susceptibles d'être utilisées, notamment pour la vectorisation de principe(s) actif(s), ces particules étant des arrangements 10 supramoléculaires individualisés :

- à base d'au moins un copolymère amphiphile comprenant :
 - ✓ au moins une séquence hydrophobe de polyaminoacide(s) (PAA) linéaire(s), à enchaînements α -peptidiques, les aminoacides hydrophobes AAO constitutifs de ce bloc PAA étant identiques ou différents entre eux ;
 - ✓ au moins une séquence hydrophile de polyaminoacide(s) (PAA) linéaire(s), à enchaînements α -peptidiques, les aminoacides hydrophobes AAI constitutifs de ce bloc PAA étant identiques ou différents entre eux ;
 - ✓ et au moins un bloc de polymère(s) hydrophile(s) du type polyalkylène-glycol (PAG), de préférence polyéthylène-glycol (PEG) ;
- aptes à s'associer en suspension colloïdale à l'état non dissous, au moins un PA et à libérer celui-ci, notamment 20 in vivo, de manière prolongée et/ou retardée .

Ce procédé est caractérisé en ce que :

- 1) on fait réagir au moins un bloc PAG comprenant au moins un monomère alkylène-glycol, avec au moins une séquence hydrophile de PAA comprenant au moins un monomère aminoacide AAI hydrophile et avec au moins 30 une séquence hydrophobe de PAA comprenant au moins un monomère aminoacide AAO hydrophobe, ce bloc de PAG et ces séquences comprenant chacun au moins une fonction réactive de façon à obtenir un copolymère amphiphile "bloc" PAG/polyAAI/polyAAO ;

- 2) on transfère le copolymère amphiphile bloc PAG/polyAAI/polyAAO obtenu à l'étape 1, dans un milieu non-solvant de la (des) fraction(s) hydrophobe(s) du copolymère amphiphile - de préférence dans l'eau -, ce qui conduit à la formation spontanée de particules de vectorisation (PV) ;
- 3) éventuellement on dialyse le milieu réactionnel pour purifier la suspension aqueuse de particules structurées ;
- 10 4) éventuellement on concentre cette suspension de l'étape 3 ;
- 5) éventuellement on associe au moins un principe actif PA avec les particules de l'étape 2, 3 ou 4 ;
- 6) on élimine le milieu liquide pour recueillir le solide pulvérulent comprenant les particules chargées ou non.

20 Au sens de l'invention, l'expression "non-solvant" signifie que les fractions du copolymère amphiphile considéré, ont par exemple une solubilité inférieure à 1g/l, à 25°C dans le milieu non-solvant considéré.

En fin d'étape 2, le milieu liquide ne forme pas une solution homogène, mais se sépare en une phase dispersée (PV) et une phase pauvre en copolymère amphiphile "bloc".

25 Les fonctions réactives du (ou des) bloc(s) PAG et des séquences polyAAO et polyAAI de l'étape 1, peuvent être des fonctions amine ou acide carboxylique. On peut envisager de réaliser la polymérisation conduisant au(x) bloc(s) PAG et/ou au(x) séquence(s) hydrophile(s) PolyAAI et/ou au(x) séquence(s) hydrophobe(s) PolyAAO avant, pendant ou après la formation de 30 la liaison PAG-PolyAAI et/ou PAG-PolyAAO et/ou PolyAAI-PolyAAO.

Toutes ces variantes sont à la portée de l'homme de l'art.

De préférence, dans l'étape 1 :

- 35 1.1) on réalise une copolymérisation de monomères formés par des anhydrides de N-CarboxyAminoacides (NCA) d'au

moins deux types différents, d'une part, des NCA-pAAI («pAAI » désignant un précurseur d'AAI) et, d'autre part, des NCA-AAO en présence :

- d'au moins un solvant polaire, de préférence choisi dans le groupe comprenant : la N-MéthylPyrrolidone (NMP), le DiMéthylFormamide (DMF), le DiMéthylsulfOxyde (DMSO), le DiMéthylAcétamide (DMAc), la pyrrolidone ; la NMP étant plus particulièrement préférée ;
 - et éventuellement d'au moins un co-solvant sélectionné parmi les solvants aprotiques (de préférence le dioxanne-1,4) et/ou les solvants protiques (de préférence la pyrrolidone) et/ou l'eau et/ou les alcools, le méthanol étant particulièrement préféré ;
 - on transforme les motifs récurrents pAAI du copolymère précurseur PAA des particules, en motifs récurrents AAI, en mettant en œuvre une hydrolyse, de préférence acide, pour laquelle on ajoute au milieu organique susdéscrit une phase aqueuse acide ;
- 1.2) on met en œuvre ou on prépare par polymérisation de monomères alkylène-glycol (de préférence ethylène ou propylène-glycol) au moins un bloc polymère PAG de poly-alkylène-glycol (de préférence de PEG ou PPG); ce bloc PAG étant fonctionnalisé (avantageusement seulement à l'une de ses extrémités) par un groupement réactif, de préférence choisi dans le groupe comprenant les amines (en particulier les amines primaires ou secondaires), les alcools ou les thiols, les acides carboxyliques activées (par réaction préalable avec du dicyclohexylcarbodiimide, carbonyldiimidazole ou autre réactif connu à l'homme du métier) ;

1.3) on ajoute le PAG fonctionnalisé de l'étape 2 au milieu de polymérisation des séquences hydrophiles polyAAI et hydrophobes polyAAO, avant, pendant ou après la polymérisation.

5

L'étape 1.1 du procédé s'inspire des techniques connues de polymérisation d'anhydrides de N-carboxy-(α -aminoacides (NCA), décrites, par exemple, dans l'article « Biopolymers, 15, 1869 (1976) » et dans l'ouvrage de H.R. KRICHELDORF « α -Aminoacid-N-carboxy-Anhydride and Related Heterocycles » Springer Verlag (1987).

Suivant une variante, lors de l'étape 1.1, on précipite - de préférence dans l'eau- le copolymère poly(AAO)-poly(AAI) obtenu et on recueille ce précipité. Cette variante correspond à un mode discontinu de préparation de particules, dans lequel on isole le copolymère poly(AAO)-poly(AAI) sous forme de précipité formant un produit intermédiaire stable. Ce précipité peut être, par exemple, filtré, lavé et séché.

De manière plus préférée encore, les NCA-pAAI sont des NCA 20 d'acide glutamique ou aspartique O-alkylé, par exemple des NCA-Glu-O-Me, NCA-Glu-O-Et ou NCA-Glu-O-Bz (Me = méthyle - Et = éthyle).

Plus généralement, la préparation des particules peut s'opérer e.g. par addition d'un non-solvant de la fraction 25 hydrophobe à une solution du copolymère amphiphile dissous dans un solvant, avantageusement suite à la synthèse du terpolymère. L'addition de la solution du terpolymère à un non-solvant de la fraction hydrophobe constitue une variante de ce procédé. L'opération consiste préférentiellement à diminuer la 30 solubilité de la fraction hydrophobe pour qu'elle s'agrège, et ce faisant, à former des PV. L'homme de l'art est en mesure de trouver d'autres moyens pour diminuer la solubilité de la fraction hydrophobe du polymère, en modifiant, par exemple, la température, la nature du solvant(s) et du non solvant, ou en 35 combinant différentes techniques.

Par exemple, lors de cette préparation de suspension colloïdale, les copolymères amphiphiles PAG-poly(AAI)-poly(AAO) de l'étape 1 sont placés dans un milieu aqueux dans lequel au moins une partie des PAG est soluble et au moins une partie des AAO est insoluble. Les copolymères PAG-polyAAI-polyAAO existent sous forme de nanoparticules dans ce milieu aqueux.

Une alternative pour préparer la suspension de PV selon l'invention consiste à mettre en présence le solide pulvérulent, tel que décrit ci-dessus en tant que produit et par son procédé d'obtention, avec un milieu aqueux, et en particulier avec de l'eau, non-solvant de la fraction hydrophobe du copolymère amphiphile.

Ainsi, les PV peuvent être obtenues dans l'eau en absence de tout solvant ou de tensioactif.

De préférence, le ou les bloc(s) PAG fonctionnalisé(s) est (sont) introduit(s) avant et/ou au début de la polymérisation, qui se déroule de préférence à une température comprise entre 20 et 120°C à pression atmosphérique normale.

Avantageusement, les PAG de l'étape 1.2 sont des produits commerciaux disponibles (PEG e.g.), ou bien encore sont obtenus de manière connue en soi par polymérisation d'oxyde d'éthylène.

D'autres paramètres, comme la concentration en polymère, la température du mélange réactionnel, le mode d'ajout du polymère hydrophile, l'emploi de pression réduite, la durée de la réaction, etc... sont ajustés selon les effets désirés et bien connus de l'homme de l'art.

La description des caractéristiques des polymères, faite supra dans le cadre de la présentation des particules, peut être intégralement transposée dans le présent exposé relatif au procédé. C'est ainsi que, conformément au procédé selon l'invention, on peut choisir la nature et la quantité des aminoacides récurrents, ainsi que les conditions opératoires, de manière à obtenir différents types de polymères ayant les caractéristiques susvisées.

Pour effectuer l'association (étape 3) d'un ou plusieurs PA aux particules, il est possible de mettre en œuvre plusieurs méthodes conformément à l'invention. Des exemples, non limitatifs, de ces méthodes sont énumérés ci-après.

5 Selon une première méthode, on effectue l'association de PA aux particules par mise en présence d'une phase liquide (aqueuse ou non) contenant le PA avec la suspension colloïdale de particules.

10 Selon une deuxième méthode, on effectue l'association du PA aux particules par mise en présence d'un PA à l'état solide avec la suspension colloïdale de particules. Le PA solide peut être, par exemple, sous forme de lyophilisat, de précipité, de poudre ou autre.

15 Selon une troisième méthode, on met en présence le solide pulvérulent (PAA), tel que décrit supra en tant que produit et par ses caractéristiques d'obtention, avec une phase liquide (aqueuse ou non) contenant le PA.

20 Selon une quatrième méthode, on met en présence le solide pulvérulent, tel que décrit supra en tant que produit et par ses caractéristiques d'obtention, avec le PA sous forme solide. On disperse ensuite ce mélange de solides, dans une phase liquide, de préférence une solution aqueuse.

Dans toutes ces méthodes, le PA utilisé peut être sous forme pure ou préformulée.

25 La préparation des PV est avantageusement suivie d'une étape de purification, impliquant des techniques connues à l'homme du métier. Après cette étape facultative de purification, on dispose d'une suspension colloïdale de PV que l'on peut utiliser directement, ou qu'il est envisageable 30 d'isoler ou de recueillir par tout moyen physique connu en soi et approprié, comme par exemple : par filtration, par concentration, par ultrafiltration, par séparation par gradient de densité, par centrifugation, par précipitation, éventuellement par ajout de sel, ou bien encore par 35 lyophilisation.

Conformément à l'étape facultative 5, on élimine les impuretés (sels) ainsi que le solvant, par tout traitement de séparation physique approprié, par exemple par diafiltration (dialyse) (étape 4), filtration, modification pH, 5 chromatographie, la distillation. De telles méthodes permettent d'éliminer les sels ou les solvants indésirables.

Pour concentrer (étape 6) ou pour séparer (étape 7) les particules structurées obtenues de leur milieu liquide de suspension, on élimine, éventuellement, la phase aqueuse, par 10 exemple par distillation par séchage (e.g. à l'étuve), par lyophilisation ou tout autre moyen physique convenable : ultrafiltration, centrifugation. On récupère, à l'issue de cette étape 7, un solide pulvérulent, de couleur blanche.

Compte tenu de la taille nanométrique des particules, la 15 suspension peut être filtrée sur des filtres de stérilisation, ce qui permet d'obtenir, aisément et à moindre coût, des liquides médicamenteux injectables stériles. Le fait de pouvoir, grâce à l'invention, contrôler la taille des particules et atteindre des valeurs de diamètre hydrodynamique 20 (Dh) entre 25 et 100 nm, est un atout important.

La présente invention vise, également, de nouveaux produits intermédiaires du procédé décrit ci-dessus, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des copolymères PAG-polyAAI-polyAAO précurseurs de particules.

25 Selon un autre de ses aspects, l'invention concerne une suspension et/ou un solide pulvérulent, tels que définis ci-dessus et/ou tels qu'obtenus par le procédé présenté supra, cette suspension et ce solide comprenant au moins un principe actif, choisi, de préférence, parmi :

- 30 • les vaccins pris à eux seuls ou associés à au moins un antigène;
- les protéines et/ou les peptides, parmi lesquels les plus préférentiellement retenus sont : les hémoglobines, les cytochromes, les albumines, les interférons, les antigènes, les anticorps,

l'érythropoïétine, l'insuline, les hormones de croissance, les facteurs VIII et IX, les interleukines ou leurs mélanges, les facteurs stimulants de l'hématopoïèse ;

- 5 • les polysaccharides, l'héparine étant plus particulièrement sélectionnée ;
- les acides nucléiques et, préférablement, les oligonucléotides d'ARN et/ou d'ADN ;
- des molécules non peptido-protéiques appartenant à diverses classes de chimiothérapie anticancéreuses et, en particulier, les anthracyclines et les taxoides ;
- 10 • et leurs mélanges.

Enfin, l'invention concerne une spécialité pharmaceutique, nutritionnelle, phytosanitaire ou cosmétique, caractérisée en ce qu'elle comporte une suspension et/ou du solide pulvérulent chargé(s) en PA et tels que définis ci-dessus.

Selon un autre de ses objets, l'invention vise, également, l'utilisation de ces PV (en suspension ou sous forme solide) chargées en PA, pour la fabrication de médicaments du type systèmes à libération contrôlée de PA.

Il peut s'agir, par exemple de ceux administrables, de préférence par voie orale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, 25 intrapéritonéale, ou intracérébrale.

Les applications cosmétiques envisageables sont, par exemple, les compositions comprenant un PA associé aux PV selon l'invention et applicables par voie transdermique.

30 Les exemples qui suivent et qui concernent le PA hydrophile formé par l'insuline permettront de mieux comprendre l'invention dans ses différents aspects produit/procédé/application. Ces exemples illustrent la préparation de particules de polyaminoacides chargés ou non en

PA, de même qu'ils présentent les caractéristiques de structure et les propriétés de ces particules.

LEGENDES DES FIGURES

- 5 Fig 1 - Schéma d'une particule de vectorisation du type de celles adsorbant le PA.
- Fig 2 - Schéma d'une particule de vectorisation du type de celles encapsulant le PA.
- Fig 3 - Evolution de la glycémie G (moyenne en % basal) après 10 injection d'une formulation de PV (exemple 5) chargée en insuline à raison de 0,6 UI/kg, en fonction du temps t (en heures).
- Fig 4 - Photographie de PV (exemple 2) au microscope électronique à transmission.
- 15 Fig 5 - Evolution de la glycémie (moyenne en % basal) et de l'insulinémie moyenne I (en mU/l) chez des chiens, en fonction du temps t (en heures), après injection d'une formulation de PV (exemple 6) chargée en insuline à raison de 0,6 UI/kg.
- Fig 6 - Evolution de la glycémie G (moyenne en % basal) et de 20 l'insulinémie moyenne I (en mU/l) chez des chiens, en fonction du temps t (en heures), après injection d'une formulation de PV (exemple 9) chargée en insuline à raison de 0,6 UI/kg.

25 EXEMPLES

Exemple 1 : Préparation du poly(leucine)12-bloc-poly(glutamate)35-(polyéthylèneglycol)113.

- 30 Les techniques utilisées, pour la polymérisation des NCA en polymères de structures en blocs ou statistiques sont connues de l'homme de l'art et sont détaillées dans l'ouvrage de H. R. KRICHELDORF « a-aminoacides-N-Carboxy Anhydrides and Related Heterocycles », Springer Verlag (1987). La synthèse suivante 35 précise la synthèse de l'un d'entre eux.

4,96 g de aminoethyl-PEG (masse molaire 5000; Degré de Polymérisation (DP) 113) sont solubilisés dans 120 ml de NMP à 40°C. On y ajoute 1.4ml MeOH puis, 6.4 g de NCA-GluOMe en une fois. Après 1/2h, 1.8 g de NCA-Leu sont ajouté est la réaction 5 se poursuit pendant 2h. Ensuite, on ajoute au milieu réactionnel de l'acide chlorhydrique dilué et on chauffe à 80°C pendant 24h. A 50°C, le milieu est neutralisé avec de la soude 6N. On dialyse cet intermédiaire contre de l'eau pour éliminer les résidues solubles de faible taille (solvant, sels). La 10 solution purifiée est lyophilisée pour donner une poudre blanche. Rendement 80%.

15 Exemple 2 : Préparation du poly(leucine)12-bloc-
poly(glutamate)18 -(polyéthylèneglycol)17

2,01 g de aminoethyl-PEG (masse molaire 750; DP 17) sont solubilisés dans 45 ml de NMP à 40°C. On y ajoute 1.5ml MeOH 20 puis, 9 g de NCA-GluOMe en une fois. Après 1/2h, 5 g de NCA-Leu sont ajouté est la réaction se poursuit pendant 2h. Ensuite, on ajoute au milieu réactionnel de l'acide chlorhydrique dilué et on chauffe à 80°C pendant 24h. A 50°C, le milieu est neutralisé avec de la soude 6N. On dialyse cet intermédiaire contre de 25 l'eau pour éliminer les résidus solubles de faible taille (solvant, sels). La solution purifiée est lyophilisée pour donner une poudre blanche. Rendement 80%.

Exemple 3: Mise en évidence des nanoparticules par
30 Diffusion de la Lumière (DDL) et par Microscopie Electronique à Transmission (TEM).

10 mg du copolymère obtenu à l'exemple 1 ou 2 sont suspendus dans 10 ml d'eau ou une solution aqueuse de sel. Cette solution est 35 ensuite introduite dans un granulomètre Coulter (ou

diffractomètre laser). Les résultats de l'analyse de la granulométrie des différents produits testés sont présentés dans le tableau 1 suivant.

Tableau 1 - Mesures de la taille des PV

5

Exemple	Polymère	Taille (nm)
1	PEG ₁₁₃ -(GLU) 35-(LEU) 12	80
2	PEG ₁₇ -(GLU) 18-(LEU) 12	41

On photographie par ailleurs au microscope électronique à transmission (Fig.4 ci-jointe), les particules de vectorisation PV préparées dans le présent exemple par mise en suspension du 10 copolymère amphiphile de l'exemple 2 dans l'eau.

Exemple 4 : Test d'association des nanoparticules avec une protéine (l'insuline).

15 A partir d'une solution tampon phosphate isotonique de pH 7,4, on prépare une solution d'insuline humaine titrée à 1,4 mg/ml correspondant à 40 UI/ml. Dans 1 ml de cette solution d'insuline, on disperse 10 mg du copolymère amphiphile selon 20 l'exemple 1 ou 2. Après 15 heures d'incubation à température ambiante, l'insuline associée aux particules de vectorisation PV et l'insuline libre sont séparées par centrifugation (60 000 g, 1 heure) et ultrafiltration (seuil de filtration 300 000 D). L'insuline libre récupérée dans le filtrat est dosée par Chromatographie Liquide Haute Performance ou par ELISA et l'on 25 en déduit par différence la quantité d'insuline associée.

Le tableau 2 suivant rassemble les résultats des mesures de taux d'association effectuées sur différents PV. Le taux d'association exprime le pourcentage d'insuline associée par rapport à l'insuline engagée dans une préparation titrée à 30 1,4mg/ml d'insuline et 10 mg/ml de PV. Cette valeur est transformée en un taux de chargement qui exprime la quantité

maximale en mg d'insuline que peuvent s'associer avec 100 mg de PV.

Tableau 2 - Mesures du taux d'association avec l'insuline pour
5 un mélange 0.14 mg INSULINE/mg PV

Exemple	Polymère	Taux max. de chargement mg/100mg PV
1	PEG ₁₁₃ - (Glu) ₃₅ -(Leu) ₁₂	10
2	PEG ₁₇ - (Glu) ₁₈ -(Leu) ₁₂	19

Exemple 5 : Pharmacocinétique et pharmacodynamie des PV-
10 charges avec l'insuline chez le chien sain à jeun.

La suspension de PV chargée en insuline préparée à l'exemple 4.
a été injectée à deux chiens, rendus diabétiques par
pancréatectomie totale, et à jeun de la veille au soir.
15 L'administration à 11 heures du matin par voie sous cutanée
thoracique de la préparation a été faite à la posologie de
0,5 UI/kg d'insuline par Kg de poids vif de l'animal. Le volume
administré est compris entre 0,18 et 0,24 ml. Au temps -4, -2,
0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 et 48
20 heures, 1 ml de sang sont prélevés par ponction jugulaire sous
vide sur tube héparinate de sodium. 30 µl de sang total sont
utilisés extemporanément pour mesure de la glycémie. Le tube
est ensuite centrifugé, décanté et le plasma stocké à -20° C
pour dosage de l'insuline. Les résultats présentés dans la
25 figure 3 ci-après montrent un effet hypoglycémiant important
(sur les deux animaux) qui se prolonge au moins jusqu'à 24
heures après l'injection.

Tableau 3 - Mesures du temps d'action de l'insuline (effet hypoglycémiant) en présence de PV selon l'invention

Exemple	Polymère	Temps de retour au niveau basal de la glycémie (en heures)	
	INSULINE SOLUBLE (SANS PV)	1	
1	PEG ₁₁₃ - (GLU) 35- (LEU) 12	-	-
2	PEG ₁₇ - (GLU) 18- (LEU) 12	≥ 30	FIGURE 3

- 5 Cet exemple démontre la non dénaturation de l'insuline en présence de PV selon l'invention.
 De plus, cet exemple permet de mettre en évidence l'augmentation à plus de 30h de la durée d'action de l'insuline par rapport à l'insuline non formulée, et donc, l'utilité des
 10 PV en tant que système retard pour la libération contrôlée de l'insuline. Elle montre également comment il est possible de maîtriser la durée d'action par le choix judicieux du groupement hydrophobe.

15

Exemple 6 comparatif: Préparation du polymère - poly(leucine)₄₀-bloc-(polyéthylèneglycol)₁₁₃.

Synthèse de la poly(Leu)₄₀-PEG: 10 g de NCA-Leu sont solubilisés
 20 dans 150 ml de NMP à 60°C. 5 ml d'une solution de 2 g de aminoéthyl-PEG (Mw 5000) dans 50 ml de NMP sont ajoutés au monomère en une fois. Après 2 h, on vers le milieu réactionnel dans 1L d'eau. Le précipitat formé est filtré, lavé et séché. Rendement >95%.

25 Le précipitat est dissout dans 100ml d'acide trifluoroacétique, puis on y ajoute 40 ml d'eau sur une période d'une heure. La suspension est ensuite neutralisé à l'aide de la soude, dialysé contre de l'eau pour éliminer les sels ainsi formés, et lyophilisé pour obtenir un produit solide.

30

Exemple 7 comparatif : Pharmacocinétique et pharmacodynamie des PV-associés avec l'insuline chez le chien sain à jeun.

Les PV de l'exemple 6 sont formulées puis injectées dans des animaux selon le protocole donné à l'exemple 5. Les résultats présentés dans la figure 5 ci-après, montrent un effet hypoglycémiant (sur les deux animaux) et qui se prolonge jusqu'à 20 heures après l'injection.

10

Exemple 8 : comparatif de stabilité de la formulation

Les PV de l'exemple 6, PEG-Leu₂₅ sont formulées selon l'exemple 7. La formulation, après un repos de 1 mois à +4°C, forme un dépôt de précipitat, qui ne se dissout pas à 35°C, montrant l'instabilité de cette formulation de PV.

Les PV de l'exemple 1 (poly(leucine)12-bloc-poly(glutamate)35 - poly(éthylèneglycol-)113 sont formulées selon l'exemple 7. La formulation, après un repos de 1 mois à +4°C, reste 20 transparente et ne forme pas de dépôt de précipitat, montrant la stabilité de cette formulation de PV et donc l'avantage d'un polymère tribloc PEG-polyAAI-polyAAO par rapport au copolymère dibloc PEG-polyAAO.

25

Exemple 9 comparatif: Préparation du polymère - poly(leucine)12-bloc-(glutamate de sodium)35 et son analyse pharmacodynamique.

Le polymère est réalisé selon l'exemple 1 avec la modification suivant, l'aminoéthyl-PEG de Mw = 5000 et de DP = 113 est remplacé par une quantité équivalente en moles d'ammoniaque. Les PV sont isolées, formulées et injectées selon les exemples précédents (exemples 2 et 5) à raison de 50mg de PV pour 100UI d'insuline. Les résultats présentés dans la figure 6 ci-après

montrent un effet hypoglycémiant (sur les deux animaux) et qui se prolonge jusqu'à 20 heures après l'injection.

5

Commentaires:

tableau 4 comparatif des durées d'action in vivo de l'insuline nue, de l'insuline associée à des systèmes de vectorisation de l'art antérieur (exemples comp 6 et 8) et de l'insuline associée aux particules de vectorisation selon l'invention (exemple 2)

Exemple	Polymère	Temps de retour au niveau basal de la glycémie (h)	
	INSULINE SOLUBLE (SANS PV)	1	
2	PEG ₁₇ -(GLU) ₁₈ -(LEU) ₁₂	≥ 30	FIGURE 3
6 comp	PEG ₁₁₃ -LEU ₄₀	20	FIGURE 5
8 comp	(GLU) ₃₅ -(LEU) ₁₂	20	FIGURE 6

15

Il ressort de ce tableau que le système selon l'invention (exemple 2) possède une durée d'action in vivo largement supérieure (+ de 30h contre 20h) à celles des systèmes de l'art antérieur (WO 96/29991): exemples 6 et 8.

REVENDICATIONS

1- Suspension colloïdale de particules submicroniques
5 susceptibles d'être utilisées, notamment pour la vectorisation
de principe(s) actif(s) (PA), ces particules étant des
arrangements supramoléculaires individualisés,
caractérisée en ce que ces particules:

- 10 • sont à base d'au moins un copolymère amphiphile
comportant :
 - ✓ au moins un bloc de polymère(s) hydrophile(s) du type
polyalkylèneglycol (PAG), de préférence polyéthylène-
glycol (PEG) ;
 - ✓ et au moins un copolyaminoacide(s) (PAA) amphiphile
linéaire(s), à enchaînements α -peptidiques;
- 15 • et sont aptes à s'associer en suspension colloïdale à
l'état non dissous, avec au moins un PA et à libérer
celui-ci, notamment *in vivo*, de manière prolongée et/ou
retardée.

20

2- Suspension selon la revendication 1, caractérisée en ce
que les AminoAcides du (ou des) copolyaminoacide(s) (PAA)
amphiphile (s) composant les particules sont d'au moins deux
types :

- 25 • un premier type comportant au moins un AminoAcide
hydrophile (AAI), de préférence sélectionné(s) dans le groupe
comportant :
 - les AminoAcides à chaîne(s) ionisable(s), au moins
partiellement ionisés, de préférence Glu et/ou Asp et
30 leurs sels et/ou Lys;
 - et leurs mélanges.
- 35 • un deuxième type comportant au moins un AminoAcide
hydrophobe (AAO), de préférence sélectionné(s) dans le groupe
comportant :

- les acides aminés neutres naturels, avantageusement ceux du sous-groupe : Leu, Ile, Val, Ala, Pro, Phe, et leurs mélanges ;
- des acides aminés neutres, rares ou synthétiques , avantageusement ceux du sous-groupe : norleucine, norvaline et leurs mélanges;
- des dérivés des acides aminés polaires avantageusement ceux du sous-groupe : glutamate de méthyle, glutamate d'éthyle, aspartate de benzyle, N-acétyllysine et leurs mélanges;
- et leurs mélanges.

5 3- Suspension selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que le copolyaminoacide(s) (PAA) amphiphile (s) composant les particules comporte au moins un séquence globalement hydrophile et au moins une séquence globalement hydrophobe.

15 4- Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le copolyaminoacide(s) (PAA) amphiphile (s) composant les particules présente une structure "statistique".

20 5- Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le copolyaminoacide(s) (PAA) amphiphile (s) composant les particules présente une structure "bloc".

25 6- Suspension selon la revendication 5, caractérisée en ce que le PAA amphiphile "bloc" comporte avantageusement:

- 30 o au moins une séquence globalement hydrophile essentiellement constituée d'acides AAI, et ayant une longueur absolue supérieure ou égale à 5 monomères AAI, de préférence supérieure ou égale à 200 monomères AAI, et

plus préférentiellement encore comprise entre 10 et 50 monomères AAI ;

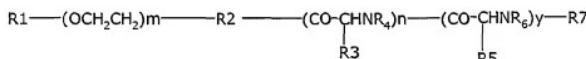
- o et au moins une séquence globalement hydrophobe essentiellement constituée d'aminoacides AAO, ayant une longueur absolue supérieure ou égale à 5 monomères AAO, de préférence supérieure ou égale à 10 monomères AAO, et plus préférentiellement comprise entre 10 et 50 monomères AAO.

5

10 7-. Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que le PAG hydrophile - de préférence le PEG -, se présente sous la forme d'un bloc dont la longueur absolue est supérieure ou égale à 5 monomères, de préférence comprise entre 5 et 120 monomères, et plus préférentiellement encore comprise entre 5 et 50 monomères.

15

8- Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 et 5 à 7, caractérisée en ce que les particules sont 20 constituées de chaînes de copolymères "triblocs linéaires" PEG/AAI/AAO, correspondant de préférence à la formule suivante:



25 dans laquelle :

- ◆ R₁ = H, alkyle linéaire ou branché en C₁-C₂₀ (substitué ou non), aryle de préférence benzyle (substitué ou non) ;
- ◆ R₂ = NH, CO-NH, CS-NH, R₈-(CH₂)_t-R₉ avec R₈, R₉ choisi indépendamment parmi = OCO, OCONH, NHCO, NHCONH, CONH, COO, NH, CO; t = 1-6, [NHCH(R₁)CO-]_x;
- ◆ R₃ = radicaux identiques ou différents le long de la chaîne et choisis parmi les groupements

30

définissant des aminoacides hydrophiles, ionisables (naturels ou dérivés synthétiques) à savoir de préférence les groupements $(CH_2)_pC_6H_4OM$, $(CH_2)_pCO_2M$, $(CH_2)_pN(H_2R1d)_3X$ avec $p \geq 1$, de préférence = 1 ou 2; a et b sont des valeurs comprise entre 0 et 3 et $a+b = 3$; X étant de préférence un anion chlorure, bromure, sulfate, nitrate, hydrogénophosphate, acétate, lactate ;

- 10 ⇒ R4 = radicaux identiques ou différents le long de la chaîne et choisis parmi les groupements H, Me ;

15 ⇒ R5 = radicaux identiques ou différents le long de la chaîne et choisis parmi les groupements définissant des aminoacides hydrophobes (naturels ou dérivés synthétiques) à savoir de préférence les à savoir de préférence les groupements H, R1, $(CH_2)_qC_6H_5$, $(CH_2)_qC_6H_4OR_1$, $(CH_2)_qOR_1$, $(CH_2)_qCO_2R_1$, $(CH_2)_qCON(R1)_2$, avec $q \geq 1$, de préférence = 1 ou 2 ;

20 ⇒ R6 = R4 ;

25 ⇒ R7 = H, R1CO avec R1 tel que défini supra, alkyle linéaire ou branché en C₁-C₂₀ (substitué ou non), aryle de préférence benzyle (substitué ou non), hydroxyalkyle en C₁-C₆, H, $-(CH_2)_wOH$, $-(CH_2)_wCO_2M$, $-(CH_2)_w(CHR1)_zOH$, $-(CH_2)_yNH_2$, $-(CH_2)_yC_6H_4OH$, $(CH_2)_yCO-N(R1)_2$; R10 = H, Me, $(CH_2)_vOH$, avec w, z et v ≥ 1 et M = métal ou cation, typiquement un métal alcalin comme Na, Li, K, ou NH₄, R1NH₃ ;

30 ⇒ m > 1; n > 3.; v ≥ 0 .

9- Suspension selon l'une quelconque des revendications 1
30 à 8, caractérisée en ce que les particules de vectorisation
(PV) ont une taille moyenne comprise entre 10 à 500 nm, de
préférence entre 10 et 200 nm.

10- Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que les particules de vectorisation (PV) comprennent au moins un principe actif.

5 11- Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'elle est aqueuse et stable.

12- Solide pulvérulent, caractérisé en ce qu'il est obtenu
à partir de la suspension selon l'une quelconque des
10 revendications 1 à 11.

13- Procédé de préparation d'un solide pulvérulent obtenu
à partir de la suspension selon l'une quelconque des
revendications 1 à 3 et 5 à 11,
15 caractérisé en ce que :

- 1) on fait réagir au moins un bloc PAG comprenant au moins un monomère alkylène-glycol, avec au moins une séquence hydrophile de PAA comprenant au moins un monomère aminoacide AAI hydrophile et avec au moins une séquence hydrophobe de PAA comprenant au moins un monomère aminoacide AAO hydrophobe, ce bloc de PAG et ces séquences comprenant chacun au moins une fonction réactive de façon à obtenir un copolymère amphiphile "bloc" PAG/polyAAI/polyAAO ;
- 2) on transfère le copolymère amphiphile bloc PAG/polyAAI/polyAAO obtenu à l'étape 1, dans un milieu non-solvant de la (des) fraction (s) hydrophobe(s) du copolymère amphiphile - de préférence dans l'eau -, ce qui conduit à la formation spontanée de particules de vectorisation de PA ;
- 3) éventuellement on dialyse le milieu réactionnel pour purifier la suspension aqueuse de particules structurées;
- 4) éventuellement on concentre cette suspension de l'étape 3;

- 5) éventuellement on associe au moins un principe actif PA avec les particules de l'étape 2, 3 ou 4 ;
- 6) on élimine le milieu liquide pour recueillir le solide pulvérulent comprenant les particules chargées ou non.

5

14- Procédé de préparation de la suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'on met en présence d'un milieu aqueux non-solvant de la fraction hydrophobe du copolymère amphiphile, le solide pulvérulent selon la revendication 12 et/ou le solide pulvérulent obtenu par le procédé selon la revendication 13.

15- Procédé de préparation de la suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes 1,2,3,4 et éventuellement 5 du procédé selon la revendication 13.

16- Procédé de préparation de la suspension selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'on effectue l'association du PA aux particules, par mise en présence d'une phase liquide contenant ledit PA hydrophile avec la suspension colloïdale de particules.

17- Procédé de préparation de la suspension selon la revendication 11, caractérisé en ce que l'on effectue l'association du PA aux particules par mise en présence dudit PA à l'état solide avec la suspension colloïdale de particules.

18- Procédé de préparation de la suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'on met en présence le solide pulvérulent selon la revendication 12 et/ou le solide pulvérulent obtenu par le procédé selon la revendication 13, avec une phase liquide contenant le PA.

19- Procédé de préparation de la suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'on met en présence le solide pulvérulent selon la revendication 12 et/ou le solide pulvérulent obtenu par le 5 procédé selon la revendication 13, avec le PA sous forme solide et en ce que l'on disperse ce mélange de solides dans une phase liquide, de préférence une solution aqueuse.

20- Produits intermédiaires du procédé selon la 10 revendication 13, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des copolymères amphiphiles PAA du genre "bloc" PAG/polyAAI/polyAAO, de préférence PEG/polyGlu ou Asp/polyAANO, précurseurs de particules.

15 21- Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 et/ou obtenue par le procédé selon la revendication 13 et/ou solide pulvérulent selon la revendication 12 comprenant un moins un principe actif choisi, de préférence, parmi :

- o les vaccins pris à eux seuls ou associés à au moins 20 un antigène;
- o les protéines et/ou les peptides, parmi lesquels les plus préférentiellement retenus sont : les hémoglobines, les cytochromes, les albumines, les interférons, les antigènes, les anticorps, 25 l'érythropoïétine, l'insuline, les hormones de croissance, les facteurs VIII et IX, les interleukines ou leurs mélanges, les facteurs stimulants de l'hématopoïèse ;
- o les polysaccharides, l'héparine étant plus particulièrement sélectionnée ;
- o les acides nucléiques et, préféablement, les oligonucléotides d'ARN et/ou d'ADN ;
- o des molécules non peptido-protéiques appartenant à 30 diverses classes de chimiothérapie anti-cancéreuses

et, en particulier, les anthracyclines et les taxoides ;
o et leurs mélanges.

5 22- Spécialité pharmaceutique, nutritionnelle,
phytosanitaire ou cosmétique, caractérisée en ce qu'elle
comporte une suspension selon l'une quelconque des
revendications 1 à 11 et/ou obtenue par le procédé selon la
10 revendication 13 et/ou du solide pulvérulent selon la
revendication 12.

1/3

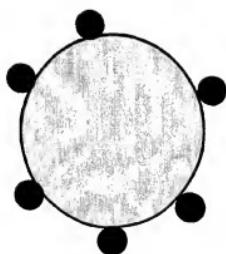


FIG.1

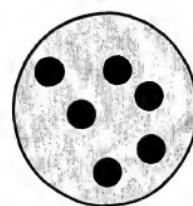
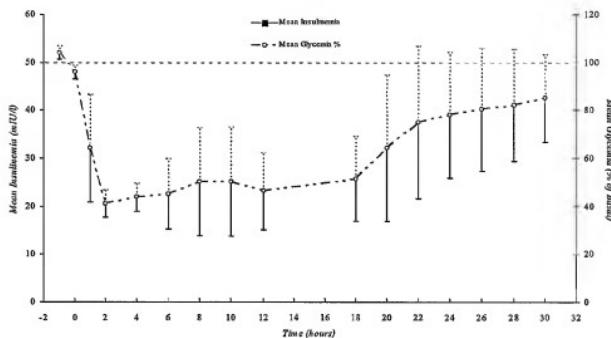
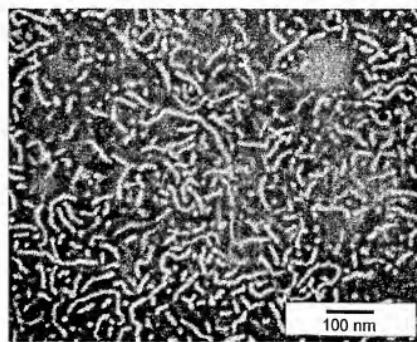
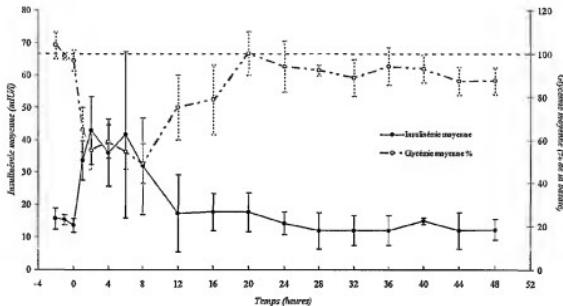
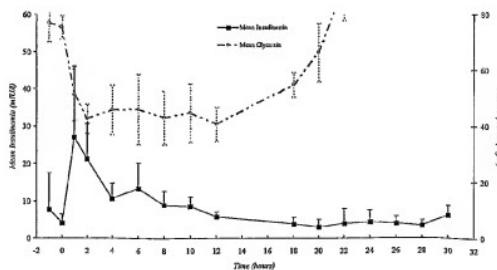


FIG.2

2/3

**FIG. 3****FIG. 4**

3/3

FIG.5FIG.6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/FR 02/01045A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K9/51

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	M. YOKOHAMA ET AL.: "Incorporation of water-insoluble anticancer drug into polymeric micelles and control of their particle size" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, vol. 55, no. 2-3, 13 November 1998 (1998-11-13), pages 219-229, XP004143517 Amsterdam (NL) the whole document --	1,2,4,7, 9-12,22
X	GB 2 240 547 A (CIBA-GEIGY AG) 7 August 1991 (1991-08-07) claims 1,3,5 --	1
A	FR 2 786 098 A (FLAMEL TECHNOLOGIES S.A.) 26 May 2000 (2000-05-26) the whole document --	1-22

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

Date of mailing of the International search report

19 July 2002

29/07/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patenttaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Benz, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 02/01045

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
GB 2240547	A 07-08-1991	NONE			
FR 2786098	A 26-05-2000	FR	2786098 A1		26-05-2000
		AU	1278000 A		13-06-2000
		EP	1131056 A1		12-09-2001
		WO	0030618 A1		02-06-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De : Internationale No
PCT/FR 02/01045

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A61K9/51

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, terme de recherche utilisé)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	M. YOKOHAMA ET AL.: "Incorporation of water-insoluble anticancer drug into polymeric micelles and control of their particle size", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, vol. 55, no. 2-3, 13 novembre 1998 (1998-11-13), pages 219-229, XP004143517 Amsterdam (NL) 1e document en entier	1,2,4,7, 9-12,22
X	GB 2 240 547 A (CIBA-GEIGY AG) 7 août 1991 (1991-08-07) revendications 1,3,5	1
A	FR 2 786 098 A (FLAMEL TECHNOLOGIES S.A.) 26 mai 2000 (2000-05-26) 1e document en entier	1-22

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document cité sans l'état général de la technique, non comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jouer un rôle sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiqué)
- *C* document cité pour une utilisation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constitutifs la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme constituant une activité brevetable si ce rapport avec le document pertinent est tellement faible que ce document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document n'est associé à un ou plusieurs autres documents de manière à ce que cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Y* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 juillet 2002

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

29/07/2002

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Paleiskaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Benz, K

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dossier International No

PCT/FR 02/01045

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
GB 2240547	A 07-08-1991	AUCUN	
FR 2786098	A 26-05-2000	2786098 A1 AU 1278000 A EP 1131056 A1 WO 0030618 A1	26-05-2000 13-06-2000 12-09-2001 02-06-2000